

METHOD AND REAGENT FOR MEASURING LIPOPROTEIN CHOLESTEROL

Patent number: JP2000325097
Publication date: 2000-11-28
Inventor: SATO HAJIME; KOYAMA TAMAMI; SAWAYANAGI TOYOJI
Applicant: SHOWA DENKO KK
Classification:
- international: C12Q1/60; C12Q1/26; C12Q1/44; G01N33/92
- european:
Application number: JP19990142450 19990521
Priority number(s): JP19990142450 19990521

Report a data error here

Abstract of JP2000325097

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for simply and accurately measuring LDL cholesterol and, if necessary, HDL cholesterol in a specimen containing lipoproteins such as serum, plasma. **SOLUTION:** A specimen containing lipoproteins is treated with an enzyme and a first surfactant to react HDL cholesterol. If necessary, a compound consumed or formed in the reaction is measured and then a second surfactant is added to the specimen to react LDL cholesterol and a compound consumed or formed in the reaction is measured.

~~~~~  
Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-325097

(P2000-325097A)

(43)公開日 平成12年11月28日(2000.11.28)

| (51)Int. Cl. <sup>7</sup> | 識別記号  | F I     | テマコード(参考) |
|---------------------------|-------|---------|-----------|
| C 1 2 Q                   | 1/60  | C 1 2 Q | 2G045     |
|                           | 1/26  |         | 4B063     |
|                           | 1/44  |         |           |
| G 0 1 N                   | 33/92 | G 0 1 N | A         |

審査請求 未請求 請求項の数6

O L

(全9頁)

(21)出願番号 特願平11-142450

(22)出願日 平成11年5月21日(1999.5.21)

(71)出願人 000002004

昭和電工株式会社

東京都港区芝大門1丁目13番9号

(72)発明者 佐藤 元

神奈川県川崎市川崎区扇町5番1号 昭和電  
工株式会社総合研究所川崎研究室内

(72)発明者 小山 珠美

神奈川県川崎市川崎区扇町5番1号 昭和電  
工株式会社総合研究所川崎研究室内

(74)代理人 100094237

弁理士 矢口 平

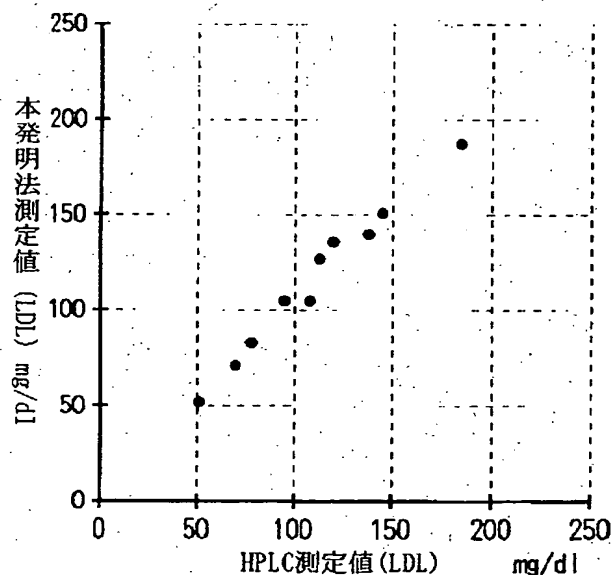
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 リポ蛋白質コレステロールの測定方法及び測定試薬

(57)【要約】

【課題】血清や血漿等のリポ蛋白質を含有する試料中のLDLコレステロール及び必要に応じてHDLコレステロールを簡便かつ正確に測定する方法を提供する。

【解決手段】リポ蛋白質を含有する試料に、酵素と第1界面活性剤を作用させることによりHDLコレステロールを反応させ、必要に応じて、その際消費される化合物または生成される化合物を測定し、次いで第2界面活性剤を添加することによりLDLコレステロールを反応させ、その際消費される化合物または生成される化合物を測定することを特徴とするリポ蛋白質コレステロールの測定方法及び測定試薬。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (1) リポ蛋白質を含有する試料に、酵素と第1界面活性剤を加えることによりHDLコレステロールを選択的に酵素反応させる第1工程、(2) 次いで、第2界面活性剤を加えることにより、LDLコレステロールを選択的に酵素反応させる第2工程、及び

(3) (1) 及び/または(2)の工程において、酵素との反応により消費される化合物または生成される化合物を測定することにより、HDLコレステロール及び/またはLDLコレステロールを測定することを含むことを特徴とするリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

【請求項2】 第1界面活性剤が、胆汁酸誘導体及び/または両性界面活性剤である請求項1に記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

【請求項3】 第2界面活性剤が、第1界面活性剤の共存下において用いることにより、第1界面活性剤により酵素反応を抑制されていたLDLコレステロールを選択的に酵素反応可能にする機能を有することを特徴とする請求項1または請求項2に記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

【請求項4】 第2界面活性剤が、ポリオキシエチレン鎖を有するノニオン性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤である請求項1ないし請求項3のいずれかに記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

【請求項5】 第2界面活性剤のHLBが、9以上11未満である請求項4に記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

【請求項6】 酵素、第1界面活性剤及び第2界面活性剤から構成されてなり、請求項1ないし請求項5のいずれかに記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法において用いるリポ蛋白質コレステロールの測定試薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、主として臨床検査の分野での使用を目的とし、リポ蛋白質を含有する試料中の特定のリポ蛋白質分画のコレステロールを定量する方法及びリポ蛋白質を含有する試料中の特定のリポ蛋白質分画のコレステロールを定量する試薬に関する。

## 【0002】

【従来の技術】一般に、血中コレステロールは血液中のリポ蛋白質に含まれるものであり、動脈硬化症や心筋梗塞に関連性が深い診断的指標として重要視されている。また、リポ蛋白質はアポリポ蛋白質と脂質の複合体であり、それぞれの比重によって高密度リポ蛋白質(HDL)、低密度リポ蛋白質(LDL)、超低密度リポ蛋白質(VLDL)及びカイロミクロン(CM)の4種類に大別される。

【0003】古くから臨床検査において実施されてきた血中総コレステロールの測定は、血中の全てのリポ蛋白質

質に含まれるコレステロールを測定するもので、上記疾患の危険度を予測するものとして重要とされてきた。しかし、近年の臨床的研究においては、LDLに含まれるコレステロールが上記疾患のより正確なリスクファクターとされ、逆にHDLに含まれるコレステロールは負のリスクファクターすなわちHDLコレステロール量と上記疾患の発生頻度の間には負の相関が成り立つため、動脈硬化に関連する疾患の診断には、HDLあるいはLDLに含まれるコレステロールを個別に測定することがより重要であるとされている(動脈硬化25(1・2):1-34, 1997)。

【0004】これらリポ蛋白質の分析法としては、比重の差を利用した超遠心法の他に電気泳動により分離したリポ蛋白質を脂質染色により検出する方法や、HPLCによる分離を行った後にコレステロールを含むピークを酵素試薬により発色検出する反応液体クロマトグラフィー法、免疫化学的方法等があるが、いずれも操作が煩雑であったり多数の検体を迅速に測定できない等の問題があり、日常的な検査にはほとんど用いられていなかった。

【0005】過去、日常的な臨床検査には、デキストラン硫酸やリンタングステン酸等のリポ蛋白質沈殿剤を用いてHDLコレステロールを測定する方法が用いられてきた。これは、先ず血清等の検体にリポ蛋白質沈殿剤とアルカリ土類金属イオンを加えてHDL以外のリポ蛋白質を凝集させ、これを遠心分離により取り除き上清中に残存するHDL中のコレステロールを測定し、さらに血中総コレステロール値と中性脂肪値を測定し、経験的に導かれたFriedewaldの式にこれらの値をあてはめてLDLコレステロール値を算出するものである。

【0006】しかしこの方法は、超遠心法等に比較して簡便ではあるものの、沈殿剤を加えて遠心分離する操作を含むため、比較的多量の検体量を要し、短時間で多数の検体を処理することが困難であった。さらに、Friedewaldの式は、VLDL中のコレステロール量と中性脂肪量の比率がほぼ一定であるという経験則から導かれたものであるため、リポ蛋白質代謝あるいは脂質代謝に異常をきたす疾患では大きな誤差を生じるという問題があった。

【0007】このような状況の中、血漿あるいは血清中のリポ蛋白質コレステロールを遠心分離等の前処理なく自動分析器に搭載可能な分別定量方法が開発されている。

【0008】それらの中で、HDLコレステロールを直接測定するための手法としては、前述の沈殿法を応用してHDL以外のリポ蛋白質を凝集させて酵素が作用しない状態にしておきHDLコレステロールを選択的に反応させる方法、及び界面活性剤等の沈殿剤以外の物質を用いてリポ蛋白質コレステロールの酵素反応をコントロールする方法の2つに大別できる。

【0009】特開平8-131197号公報では、リポ蛋白質を凝集させる方法として通常の沈殿法に用いられるHDL以外のリポ蛋白質を沈殿させる沈殿試薬により凝集を形成させ、更に一般的なコレステロール測定試薬を組み合わせて使用することにより、凝集しないHDL中のコレステロールを測定する方法が開示されているが、凝集するHDL以外のリポ蛋白質中のコレステロールも反応検出してしまう等、精度の点では満足はいく測定法ではなかった。また、特開平6-242110号公報には、HDL以外のリポ蛋白質を凝集させ、凝集しないHDL中のコレステロールのみを酵素的に反応させた後に、酵素を失活させ、同時に凝集を再溶解させて吸光度変化を測定するという手法が開示されているが、この手法は少なくとも3回の試薬を添加する操作が必要であり、限定された自動分析機にしか適用できず、汎用性の点で問題があった。

【0010】さらに、界面活性剤、ポリアニオン、あるいは抗体などの凝集剤を適宜選択することにより、HDL以外のリポ蛋白質中のコレステロールを反応阻害し、血清中のHDLコレステロールのみが優先的に反応する条件を設定した方法（特開平11-56395号公報、特開平9-96637号公報）、HDL以外のリポ蛋白質を凝集させる凝集剤とLDLコレステロール及びVLDLコレステロールの酵素反応を抑制するアルブミンの共存下でHDLを選択的に反応させ検出する方法（特開平9-285298号公報）が開示されている。

【0011】界面活性剤を用いて酵素反応をコントロールする方法として、特開昭63-126498号公報には胆汁酸塩及び非イオン系界面活性剤の存在下に酵素反応を行い、反応初期には、反応速度がLDLコレステロール濃度に比例し、その後HDLコレステロール濃度に比例することを利用した方法が開示されている。比較的疎水的なVLDLコレステロール及びLDLコレステロールがHDLコレステロールに先駆けて酵素的に反応していく現象を利用したものとなっているが、HDL中のコレステロールと他のリポ蛋白質中のコレステロールの反応を完全には分別することはできず、正確性に問題があった。また、HDL以外のリポ蛋白質に選択的に作用する界面活性剤の存在下でHDL以外のリポ蛋白質コレステロールを反応消去した後に残存するコレステロールを全て反応させHDLコレステロールを定量する方法（特開昭62-69999号公報）、さらにHDL以外のリポ蛋白質に選択的に作用する界面活性剤の存在下でHDL以外のリポ蛋白質コレステロールを反応消去した後にHDLに選択的に作用する界面活性剤を用いてHDLコレステロールを反応させ検出する方法（特開平9-299号公報）が開示されている。

【0012】その他に、リポ蛋白質凝集剤と界面活性剤を組み合わせた方法として、HDLに優先的に作用する界面活性剤とリポ蛋白質コレステロールの酵素反応を抑

制する物質の共存下でHDLを優先的に反応させ検出する方法（特開平11-56395号公報）、リポ蛋白質コレステロールの反応性をコントロールする糖化合物と界面活性剤の共存下でHDL以外のリポ蛋白質コレステロールを反応消去してHDLコレステロールを定量する方法（特開平7-301636号公報）等が開示されている。

【0013】一方、LDLコレステロールの直接測定試薬に関してもHDLコレステロールの直接測定試薬と同じような手法による測定方法が開示されている。リポ蛋白質凝集剤等を用いたLDLコレステロール測定方法として、LDLのみを凝集させる水溶性ポリマーの存在下でLDLコレステロールの凝集によって上昇する反応液濁度を測定する方法（特開平6-213899号公報）、LDLのみを凝集させる凝集剤の存在下でLDL以外のリポ蛋白質コレステロールを反応消去した後にLDLコレステロールを反応させ検出する方法（特開平7-280812号公報）、LDLのみを反応阻害する試薬の存在下でLDL以外のリポ蛋白質コレステロールを消去した後に残存したLDLコレステロールを反応させ検出する、あるいはHDL以外のリポ蛋白質コレステロールを凝集させてHDLコレステロールを反応消去した後にLDLのみに作用する酵素を用いてLDLコレステロールを測定する方法（W096/28734号公報）、LDL以外のリポ蛋白質コレステロールの酵素反応を抑制するシクロデキストリン誘導体を用いる方法（特開平10-311833号公報、特開平11-30617号公報）等が開示されている。

【0014】また、界面活性剤を用いたLDLコレステロール測定方法としては、界面活性剤濃度等特定の条件下で血清中のLDLコレステロールが優先的に酵素反応することを利用した方法（特開昭58-165800号公報）、両性界面活性剤とカルボキシル基またはスルホン基を有する脂肪族アミン類の存在下でLDLコレステロールを選択的に反応させ検出する方法（特開平10-84997号公報）、第1工程で界面活性剤を用いてLDL以外のリポ蛋白質コレステロールを全て反応させた後に残存したLDLコレステロールを第2工程で別種の界面活性剤を用いて反応させ検出する方法（特開平10-38888号公報）などが開示されている。更に、LDLのみに作用する化学修飾酵素を用いてLDLコレステロールを選択的に反応させ検出する方法（特開平10-80300号公報）も開示されている。

【0015】前述のように動脈硬化の発生頻度に対してLDLコレステロール値は正の相関を示し、逆にHDLコレステロール値は負の相関を示すため、両方のリポ蛋白質コレステロール値を測定することによって動脈硬化の発生リスクをより正確に把握することができるが、従来のリポ蛋白質コレステロールの直接的測定方法はほとんどがHDLコレステロールあるいはLDLコレステロ

ールのいずれしか定量できないものであるため、HDLコレステロールとLDLコレステロールを定量する場合には二つの測定方法を併用する必要があった。

【0016】一般に、遠心分離あるいは電気泳動等のリポ蛋白質の分離操作をしないリポ蛋白質コレステロールの直接的な測定方法を用いて両リポ蛋白質のコレステロールを同時に定量するためには、先ずHDL（あるいはLDL）コレステロールを選択的に反応させて定量した後にLDL（あるいはHDL）コレステロールを選択的に反応させて定量する手法がとられる。

【0017】例えば、WO96/28734号公報のLDLコレステロール測定方法の中の一つに、先ずHDLコレステロールを選択的に消去した後に次の工程でLDLコレステロールを選択的に反応させLDLコレステロールを定量する測定方法が開示されている。これはHDLコレステロールを消去する段階でHDLコレステロールを定量することができればHDLコレステロール及びLDLコレステロール両方の定量が可能となる測定方法である。しかしこの方法はHDLコレステロールを選択的に反応させるために、ヘパリン、リンタングステン酸、デキストラン硫酸、硫酸化シクロデキストリン、硫酸化オリゴ糖等のリポ蛋白質凝集剤と二価金属イオンにより、あるいは抗アポ抗体によりHDL以外のリポ蛋白質を凝集させて反応阻害する方法である。このようなリポ蛋白質を凝集させる方法は光学的な測定に影響し反応液の濁度を上昇させコレステロールの測定精度を低下させるという問題を持っており、HDLコレステロールを正確に定量するためにはリポ蛋白質凝集塊の溶解工程（特開平6-242110号公報）や、反応速度を測定すること（特開平8-131195号公報）が必要になる。

【0018】また、特開平11-9300号公報ではアルブミンと胆汁酸存在下でHDLコレステロールに選択的に作用する酵素を用いてHDLコレステロールを反応させ、引き続きLDLコレステロールに選択的に作用する酵素を用いてLDLコレステロールを反応させるHDLコレステロール及びLDLコレステロールの測定方法が開示されているが、LDLコレステロールを反応させるためにはHDLコレステロールを反応させる酵素とは別の酵素を使用する必要があり、他の試薬に比して酵素が高額であることから未だコスト面での問題が残されていた。

【0019】さらに、HDL以外のリポ蛋白質コレステロールに対する酵素反応を抑制する界面活性剤を利用してHDLコレステロールを定量する方法も既に多数開示されている（特開平8-116996号公報、WO97/40376号公報）。また、LDLコレステロールの酵素反応を選択的に促進する界面活性剤を利用したLDLコレステロールの選択的測定方法（特開平10-84997号公報）も開示されている。しかし、一般に界面

活性剤を混合すると各々の界面活性剤が単独で発揮する作用とは異なる作用が生じるために、単独ではLDLコレステロールに選択的に作用する界面活性剤であってもHDLコレステロールに選択的に作用する界面活性剤が共存する反応液に添加した場合にはLDLコレステロールに選択的に作用することは保証されない。

#### 【0020】

【発明が解決しようとする課題】本発明はかかる状況に鑑みてなされたものであり、特定のリポ蛋白質分画のコレステロールの測定方法において、光学的な測定を妨害し分析装置に影響を与えうる可能性のあるリポ蛋白質を凝集させることなく、必要に応じてHDLコレステロールの高精度の定量が可能であり、簡便かつ安価で汎用性の高いLDLコレステロールの測定方法及び測定試薬を提供することを目的とする。

#### 【0021】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、HDL以外のリポ蛋白質に含まれるコレステロールの酵素反応を抑制する第1界面活性剤の共存下において、ある特定の界面活性剤がVLDLには作用することなくLDLのみに選択的に作用してLDLに含まれるコレステロールと酵素が反応し得る状態にする機能を有することを見だし、本発明を完成するに至った。

【0022】すなわち本発明は、次の事項に関する。

〔1〕（1）リポ蛋白質を含有する試料に、酵素と第1界面活性剤を加えることによりHDLコレステロールを選択的に酵素反応させる第1工程、（2）次いで、第2界面活性剤を加えることにより、LDLコレステロールを選択的に酵素反応させる第2工程、及び（3）（1）及び／または（2）の工程において、酵素との反応により消費される化合物または生成される化合物を測定することにより、HDLコレステロール及び／またはLDLコレステロールを測定することを含むことを特徴とするリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

〔2〕第1界面活性剤が、胆汁酸誘導体及び／または両性界面活性剤である上記〔1〕に記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

〔3〕第2界面活性剤が、第1界面活性剤の共存下において用いることにより、第1界面活性剤により酵素反応を抑制されていたLDLコレステロールを選択的に酵素反応可能にする機能を有することの特徴とする上記

〔1〕または〔2〕に記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

〔4〕第2界面活性剤が、ポリオキシエチレン鎖を有するノニオン性界面活性剤からなる群より選ばれる少なくとも1種の界面活性剤である上記〔1〕ないし〔3〕のいずれかに記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

〔5〕第2界面活性剤のHLBが、9以上11未満であ

る上記[4]に記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法。

[6] 酵素、第1界面活性剤及び第2界面活性剤から構成されてなり、上記[1]ないし[5]のいずれかに記載のリポ蛋白質コレステロールの測定方法において用いるリポ蛋白質コレステロールの測定試薬。

#### 【0023】

【発明の実施の形態】本発明は(1)リポ蛋白質を含有する試料に酵素と第1界面活性剤を加えることにより高密度リポ蛋白質(HDL)コレステロールを酵素と反応させること、(2)次いで、第2界面活性剤を加えることにより、低密度リポ蛋白質(LDL)コレステロールを選択的に酵素と反応させること、及び(3)(1)及び/または(2)の酵素との反応により消費される化合物または生成される化合物を測定することにより、HDLコレステロール及び/またはLDLコレステロールを測定することを含むことを特徴とするリポ蛋白質コレステロールの測定方法に関する。

【0024】また、本発明は酵素とHDL以外のリポ蛋白質に含まれるコレステロールの酵素反応を抑制する第1界面活性剤と、第1界面活性剤の共存下においてLDLに含まれるコレステロールを酵素反応可能にする第2界面活性剤から構成されるリポ蛋白質コレステロールの測定試薬である。

【0025】本発明は第1工程において、酵素とHDL以外のリポ蛋白質に含まれるコレステロールの酵素反応を抑制する第1界面活性剤とをリポ蛋白質を含む試料に添加した後、酵素の活性が保持される温度範囲においてHDLに含まれるコレステロールが完全に消費されるまで反応させる。

【0026】第1工程において使用する酵素に特に制限は無く、コレステロールを測定するために通常使用されるコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールデヒドロゲナーゼを使用することができる。

【0027】用いる酵素の濃度は、試料中のコレステロールの濃度、反応温度及び反応時間等によって設定する。例えば、リポ蛋白質を含む試料が血清または血漿であり10分間程度で反応させる場合にはコレステロールエステラーゼの濃度は0.1 U/ml～50 U/ml、コレステロールオキシダーゼの場合は0.1 U/ml～10 U/mlに調製する。試薬のpHは酵素が活性を失わない範囲であればいずれでもよいがpH6.0～8.0の範囲が望ましく、1～200 mMのpH緩衝剤により調節する。pH緩衝剤にも特に制限はないが、設定したpHに対応するpKaを持つpH緩衝剤を選択するのが望ましく、N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonate) (HEPES)、Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonate) (PIPES)、3-(N-Morpholino)propane sulfonate (MOPS)などが挙げられる。

【0028】最初に作用させる第1界面活性剤はHDL以外のリポ蛋白質に含まれるコレステロールの酵素反応を抑制する機能を有する界面活性剤であって、第2界面活性剤と協同的に作用してLDLコレステロールの酵素反応を促進する機能を有するものであればいずれのものでも使用できる。例えば、胆汁酸誘導体として胆汁酸及びその塩、両性界面活性剤としてラウリルカルキル硫酸ナトリウム、N-Tetradecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate (SB3-14)、N-Hexadecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate (SB-16)、N-Octyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate (SB3-8)、N-Octadecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate (SB3-18)、N-Decyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate (SB3-10)、N-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate (SB-12)、胆汁酸誘導体で且つ両性界面活性剤である3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate (CHAPS)あるいは3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]2-hydroxypropanesulfonate (CHAPSO)等があげられ、これらのなかでも胆汁酸、CHAPS、CHAPSO、SB3-14等が好ましく用いられる。

【0029】用いる第一界面活性剤の濃度は選択した界面活性剤に応じて決められる。例えば、胆汁酸、CHAPS、CHAPSO、及びSB3-14の場合は0.01～1%好ましくは0.1～0.5%である。

【0030】本発明において、酵素の活性あるいは界面活性剤の作用に影響しないものであれば任意の物質を共存させることができる。例えば、塩化ナトリウム、リン酸カリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、塩化第1銅等の塩類、血清アルブミン等の蛋白質、アスコルビン酸オキシダーゼ、パーオキシダーゼ、カタラーゼ等の酵素、コレステロールの酵素反応生成物を定量するための色素原体等、更にはHDL以外のリポ蛋白質に含まれるコレステロールの反応を抑制する補助剤を酵素の活性あるいは界面活性剤の作用に影響しない濃度範囲で共存させることができる。

【0031】反応に要する時間は試料中に含まれるコレステロール量、酵素濃度、界面活性剤濃度、反応温度で決定されるが、HDLに含まれるコレステロールが酵素反応により生成するあるいは消費される物質を定量する一般的な方法で知ることができる。例えば、コレステロール測定用酵素としてコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼを用いた場合、コレステロールが反応して生成した過酸化水素はパーオキシダーゼの共存下4-アミノアンチピリンとN-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline (TOOS)、N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline (DAO S)、N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxy-4-fluoroaniline (FDAO S)等の

トリアンダー試薬の酸化縮合反応により生じる色素の濃度を吸光度で測定することができ、予め試薬中にパーオキシダーゼと4-アミノアンチピリン及びT O O Sを添加して反応中の吸光度を経時的に測定すると、H D L コレステロールが反応して消費される時間は吸光度が変化しなくなる時間で知ることができる。

【0032】また、コレステロールが反応する際に消費される酸素を酸素電極によって測定することによってもH D L コレステロールが反応して消費される時間を知ることができる。

【0033】コレステロール測定用酵素としてコレステロールエステラーゼ及びコレステロールデヒドロゲナーゼを用いた場合、コレステロールが反応して生成したN A D ( P ) Hを例えば340 nmの吸光度で紫外吸収で測定したり、ホルマザン色素を形成させて比色定量することができる。

【0034】本発明においては、第1工程でH D L コレステロールが反応した後の試料に、第1界面活性剤の共存下でL D L コレステロールの酵素反応を促進し、かつV L D L コレステロールの酵素反応を抑制する機能を有する第2界面活性剤を添加してL D L コレステロールを反応させる第2工程を有する。用いる第2界面活性剤としては、本発明の目的に適合するものであれば特に制限はないが、H D L 以外のリポ蛋白質コレステロールの酵素反応を抑制する第一界面活性剤として、例えば胆汁酸誘導体あるいは両性界面活性剤を用いた場合には、第2界面活性剤としてはH L B 値が9以上11未満のポリオキシエチレン鎖を有するノニオン性界面活性剤を用いることが好ましく、これによりV L D L コレステロールの反応抑制効果は維持されるがL D L コレステロールに対する反応抑制が選択的に解除されてL D L コレステロールの反応が促進される。

【0035】H L B 値が9より小さいかあるいは11以上の場合は、V L D L コレステロールの反応も促進されるため好ましくない。

【0036】ポリオキシエチレン鎖を有する界面活性剤は、特開平9-299号公報においてH D L 以外のリポ蛋白質分画中のコレステロールに対する酵素による作用を抑制する界面活性剤として開示されており、また特開平10-38888号公報ではH L B 値が11以上13未満のポリアルキレンオキサイド誘導体が全てのリポ蛋白質に作用し、H L B 値が13以上15未満のポリアルキレンオキサイド誘導体がL D L コレステロール以外のリポ蛋白質に作用することが開示されているが、その単独での作用から界面活性剤の併用によるコレステロールの分離測定の効果を確認できるものではなかった。

【0037】H L B 値が9以上11未満のポリオキシエチレン鎖を有するノニオン性界面活性剤としては、(ポリオキシエチレン)4-ラウリルエーテル、(ポリオキシエチレン)6-ラウリルエーテル、(ポリオキシエチレン)8-オレイルエーテル、(ポリオキシエチレン)10-セチルエーテル、(ポリオキシエチレン)6-ノニルフェニルエーテル等が挙げられるが、これらの中でも(ポリオキシエチレン)4-ラウリルエーテル、(ポリオキシエチレン)8-オレイルエーテルが好ましい。

【0038】尚、ノニオン性界面活性剤のH L B 値は例えば、「新・界面活性剤入門」(藤本武彦著、昭和48年、三洋化成工業株式会社発行)等の周知の方法で算出する。

【0039】これら第2試薬は単独で添加してもよいし、数種を混合してH L B 値を調整して添加してもよく、第2試薬の添加濃度は選択した界面活性剤の種類に応じて決められ、例えばポリオキシエチレンアルキルエーテルの場合は0.01~1%、好ましくは0.1~0.4%である。

【0040】用いる第2試薬のp H は酵素が活性を失わない範囲であれば特に制限はなく、また第1界面活性剤のp H と一致させる必要もない。

【0041】H D L に含まれるコレステロールが完全に消費された後に、消費されたコレステロールを定量する。定量方法としては、公知の方法、例えば反応液にパーオキシダーゼと4-アミノアンチピリン及びT O O S等のトリアンダー試薬を添加して吸光度を測定することにより消費されたH D L コレステロールを定量できる。

反応液に予めパーオキシダーゼと4-アミノアンチピリン及びトリアンダー試薬を添加して反応中の吸光度を経時的に測定する場合には反応終点の吸光度から消費されたH D L コレステロールを定量できる。

【0042】H D L コレステロールを測定する必要がない場合にはコレステロールの酵素反応生成物が以降のL D L コレステロールの測定に影響しないようにしておくのがよい。例えば、カタラーゼにより過酸化水素を分解する、あるいは反応液にパーオキシダーゼと4-アミノアンチピリンを加え4-アミノアンチピリンの無色の二量体を形成させる等の公知の方法が使用できる。

【0043】本発明においてはH D L コレステロールに作用させる酵素をL D L コレステロールにも作用させるため、L D L に作用する酵素を第2工程において新たに添加する必要はない。

【0044】本発明において、酵素の活性あるいは界面活性剤の作用に影響しない範囲内で、任意の物質を同時に添加することができる。例えば、コレステロールの測定に一般的に用いられる色素原体、パーオキシダーゼ等の酵素、塩化ナトリウム等の塩類、界面活性剤を可溶化するための別種の界面活性剤等を加えることができる。

【0045】第2工程において一定時間反応させL D L に含まれるコレステロールが消費された後に、消費されたコレステロールを公知の方法で定量することによってL D L コレステロールを測定することができる。第1工程において既にH D L コレステロールの反応生成物を定

量する色素原体等を共存させている場合には、引き続き吸光度を測定することでLDLコレステロールを定量することができる。

【0046】例えば、HDLコレステロールを定量する必要がなく、コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼを用いてコレステロールを定量する場合においては、第1工程のHDLコレステロールによって生成する過酸化水素をカタラーゼによって分解し、第2工程でカタラーゼの阻害剤であるアジ化ナトリウムを共存させ、更にパーオキシダーゼと色素原体の4-アミノアンチピリン及びトリアンダー試薬を共存させることによってHDLコレステロールを定量することなくLDLコレステロールを定量できる。あるいは第1工程でパーオキシダーゼと4-アミノアンチピリンを共存させて生成した過酸化水素を無色の4-アミノアンチピリン二量体に導いている場合には、第2工程でトリアンダー試薬を添加することによってHDLコレステロールを定量することなくLDLコレステロールを定量することができる。

【0047】このように本発明は、反応液の濁度を上昇させるリボ蛋白質凝集剤を必要とせず、使用する酵素に制限がなく、またLDLコレステロールを反応させる工程で新たに別の酵素を加える必要がなく、複数の界面活性剤を組み合わせ用いる点に特徴を有するものであり、コレステロール測定に用いられる通常の酵素をそのまま用いてLDLコレステロール及び必要に応じてHDLコレステロールを同時に定量することができる。

【0048】

【実施例】以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれら実施例になんら限定されるものではない。

(実施例1～実施例4) 10種類の血清それぞれについて下記の方法で測定を行った。

【0049】150mMの塩化ナトリウムとpH緩衝剤として3-(N-Morpholino)propanesulfonate (MOPS) 30mMを含む水溶液をpH7.0に調整し、Pseudomonas属菌由来のコレステロールエステラーゼ(5U/ml)及びPseudomonas属菌由来のコレステロールオキシダーゼ(1U/ml)とCHAPS(0.2%)を添加し、更にコレステロールの酵素反応生成物である過酸化水素を定量するためのパーオキシダーゼ(3U/ml)、4-アミノアンチピリン(1mM)、TOOS(1mM)を添加し第1工程において用いる試薬を調製した。また、150mMの塩化ナトリウムと30mMのMOPSを含む水溶液をpH7.0に調整し、下記(A)～(D)のポリオキシエチレン鎖を有するノニオン性界面活性剤0.2%を添加した第2工程における試薬を調製した。血清をアスコルビン酸オキシダーゼ(20U/ml)を含む150mM塩化ナトリウム水溶液で10倍に希釈して37℃で5分間加温した後

に、その0.1mlを予め37℃に加温した第1工程において用いる試薬0.9mlに混和して37℃で5分間反応させ(第1工程)、更に第2工程において用いる試薬1mlを追添して37℃で5分間反応させ(第2工程)、該全反応工程の反応液の吸光度(主波長550nm/副波長700nm)を経時的に測定した。別にコレステロールバルミテートを0.1%の(Octylphenoxy)polyethoxyethanol (Triton X-100)水溶液にコレステロール換算で50mg/dl相当の濃度に懸濁して調製した標準液を血清と同様に第1工程において用いる試薬と反応させて、吸光度変化量と標準液コレステロール濃度から検量線を作成し、第1工程において用いる試薬と血清を混和して5分間で反応した血清中のコレステロール濃度と更に第2工程において用いる試薬を追添してから5分間で反応した血清中のコレステロール濃度を算出した。対照法として、反応液体クロマトグラフィー法で同一の血清のHDLコレステロール及びLDLコレステロールを定量した。Shodex(昭和電工株式会社登録商標) KW-804カラム(昭和電工株式会社製)を用い150mM磷酸緩衝液(pH7.0)を溶離液として血清中のリボ蛋白質を分離し、カラム出口に溶出液とコレステロール検出液を混合させる反応コイルを接続して、反応コイル中でカラム溶出液とコレステロール検出液混合物を45℃で3分間反応させた後に、550nmの吸光度を測定することによってリボ蛋白質各分画のコレステロール量を測定した。尚、コレステロール検出液はPseudomonas属菌由来のコレステロールエステラーゼ(10U/ml)及びPseudomonas属菌由来のコレステロールオキシダーゼ(10U/ml)及びパーオキシダーゼ(20U/ml)、4-アミノアンチピリン(2mM)、TOOS(2mM)を含む0.5%Triton X-100溶液であり、溶出液と1:1に混合するように反応コイルへの流入量を調節した。また、クロマトグラム中のピークは超遠心法によって分離したHDL、LDL、VLDL分画を用いて同定した。

【0050】第1工程で反応した血清中のコレステロール濃度、第2工程で反応した血清中のコレステロール濃度、反応液体クロマトグラフィー(HPLC)によって定量した同一血清中のHDLコレステロール濃度及び反応液体クロマトグラフィー(HPLC)によって定量した同一血清中のLDLコレステロール濃度を表1に示す。

【0051】なお、実施例1から実施例4の第2工程で用いる第2界面活性剤をそれぞれ(A)～(D)として以下に示す。

(A): (ポリオキシエチレン) 3-ノニルフェニルエーテル(HLB値7.8) 花王株式会社製エマルゲン903

(B): (ポリオキシエチレン) 4-ラウリルエーテル



(HLB値9.6)花王株式会社製エマルゲン104P  
(C) : (ポリオキシエチレン) 8-オレイルエーテル  
(HLB値10.0)花王株式会社製エマルゲン408  
(D) : (ポリオキシエチレン) 8-ラウリルエーテル

(HLB値12.1)花王株式会社製エマルゲン108  
【0052】  
【表1】

| 血清No. | コレステロール測定値 (mg/dl) |       |             |      |      |      |      |
|-------|--------------------|-------|-------------|------|------|------|------|
|       | 反応HPLC法            |       | 本発明に基づく測定方法 |      |      |      |      |
|       | HDL分画              | LDL分画 | 第1工程*       | 第2工程 |      |      |      |
|       |                    |       | 実施例1~4      | 実施例1 | 実施例2 | 実施例3 | 実施例4 |
| 1     | 31                 | 136   | 32          | 156  | 137  | 139  | 153  |
| 2     | 37                 | 119   | 40          | 137  | 121  | 120  | 139  |
| 3     | 43                 | 155   | 46          | 173  | 156  | 152  | 179  |
| 4     | 34                 | 73    | 31          | 95   | 76   | 75   | 92   |
| 5     | 80                 | 94    | 78          | 111  | 93   | 96   | 108  |
| 6     | 42                 | 152   | 42          | 162  | 150  | 152  | 158  |
| 7     | 49                 | 111   | 49          | 125  | 114  | 116  | 120  |
| 8     | 47                 | 138   | 49          | 150  | 134  | 138  | 147  |
| 9     | 81                 | 128   | 79          | 155  | 131  | 130  | 143  |
| 10    | 60                 | 152   | 63          | 168  | 150  | 153  | 160  |

\*平均値

【0053】表1に示すように、第1工程で反応するコレステロールはHDLコレステロールと高い相関を示し、また、第2界面活性剤としてHLB値が9以上11未満のポリオキシエチレン鎖を有するノニオン性界面活性剤を用いた場合には、第2工程で反応するコレステロールはLDLコレステロールと高い相関を示した。

(実施例5) *Pseudomonas*属微生物由来のコレステロールオキシダーゼを *Streptomyces*属微生物由来のコレステロールオキシダーゼ (1U/m1) に、第1界面活性剤をCHAPSからSB3-14 (0.2%) へ変更し、第2界面活性剤を0.2%のポリオキシエチレンラウリルエーテル (花王株式会社製; エマルゲン104P (HLB値9.6)) とし、更に第1工程において色素原体TOOSを除き、第2工程でTOOSを1mMの濃度で添加する以外は実施例1と同様にして反応を実施した。この条件ではHDLコレステロールを定量することなくLDLコレステロールを定量することができる。反応終了後の反応液の吸光度を測定し、実施例1から実施例4において作成した検量線を用いて反応した血清中のコレステロール濃度を算出した。図1に、第1工程及び第2工程において変化した吸光度から算出した血清中のコレステロール濃度を縦軸にと

り、実施例1から実施例4と同様にして反応液体クロマトグラフィーによって定量した同一血清中のLDLコレステロール濃度を横軸にとった分散図を示す。

【0054】図1に示すように、本発明の測定方法で定量される血清中のコレステロールはLDLコレステロールと高い相関を示した。

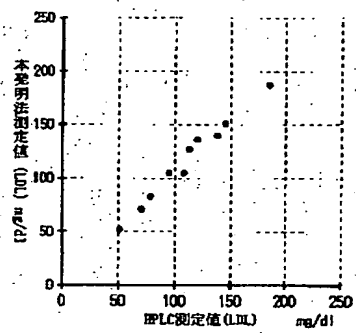
【0055】

【発明の効果】本発明によれば、反応液の濁度を上昇させるリボ蛋白質凝集剤を必要とせず、使用する酵素に制限がない上、LDLコレステロールを反応させる工程で新たに別の酵素を加える必要もなく、簡便かつ安価にLDLコレステロールを定量することができ、また必要に応じてHDLコレステロールを光学的な測定を妨害するリボ蛋白質の凝集を形成することなく正確かつ安価に測定することができる測定方法及び測定試薬を提供することができるため、特に動脈硬化症等の臨床検査の分野に有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の実施例5のリボ蛋白質コレステロールの測定方法による測定値とHPLC測定値との相関関係の一例を示す分散図である。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 澤柳 豊治  
 神奈川県川崎市川崎区扇町5番1号 昭和  
 電工株式会社総合研究所川崎研究室内

Fターム(参考) 2G045 AA13 AA25 BB29 CA25 DA62  
 DA63 DA64 DA69 FB01 JA01  
 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ76 QR03  
 QR12 QR41 QR51 QS20 QX01